

## Структурно-функциональные особенности гемоглобина крови доноров в присутствии доксициклина и мексидола

Елена Сергеевна Баева<sup>1</sup>✉, Валерий Григорьевич Артюхов<sup>2</sup>, Ольга Сергеевна Куркина<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия

<sup>2,3</sup> Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

**Аннотация.** Методом спектрофотометрии исследовано влияние растворов мексидола ( $4,47 \times 10^{-6}$  мкг/мл), доксициклина гидрохлорида ( $8,75 \times 10^{-7}$  мкг/мл) и нитрита натрия (0,14 г/мл) на структурное состояние молекул оксигемоглобина человека. Показано, что наличие модификаторов в инкубационной среде в сочетании и по отдельности способствует их определенному сродству к молекуле гемоглобина, что находит отражение в изменении соотношения лигандных форм гемопротейда. Выявлена тенденция к снижению уровня метгемоглобинообразования в образцах, содержащих доксициклин и мексидол. Предварительная инкубация растворов гемоглобина с исследуемым антибиотиком способствует уменьшению окислительного эффекта нитрита натрия в отношении молекул гемопротейда. Полученные данные подтверждают концепцию наличия неантибактериальных эффектов доксициклина.

**Ключевые слова:** эритроциты, гемоглобин, антибиотики, доксициклин, мексидол

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-4-122-126>

## Structural and functional features of donor blood hemoglobin in the presence of doxycycline and mexidol

Elena S. Baeva<sup>1</sup>✉, Valery G. Artyukhov<sup>2</sup>, Olga S. Kurkina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia

<sup>2,3</sup> Voronezh State University, Voronezh, Russia

**Abstract.** The effect of mexidol, doxycycline hydrochloride and sodium nitrite solutions on human oxyhemoglobin molecules was studied by spectrophotometry. It is shown that the presence of modifiers in the incubation medium in combination and separately contributes to their specific affinity to the hemoglobin molecule, which is reflected in the change in the ratio of ligand forms of hemoprotein. A tendency to decrease the level of methemoglobin formation in samples containing doxycycline and mexidol was revealed. Preliminary incubation of hemoglobin solutions with antibiotics studied helps to reduce the oxidative effect of sodium nitrite against hemoprotein molecules. The data obtained confirm the concept of the presence of non-antibacterial effects of doxycycline.

**Keywords:** erythrocytes, hemoglobin, antibiotics, doxycycline, mexidol

Использование лекарственных препаратов в практической медицине нередко сопровождается проявлением последними побочных эффектов различной этиологии. В последнее время появляется все большее количество работ, доказывающих негативное влияние терапевтических агентов на компоненты крови человека. Изменение кислородтранспортных и иных свойств эритроцитов – залог снижения адаптивных возможностей организма и, в конечном итоге, его функциональных резервов. Исследование взаимосвязи изменения структурно-функциональных свойств форменных элементов крови от присутствия модификаторов в инкубационной среде позволит выявить пути повышения их терапевтической эффективности и снизить вероятность проявления нежелательных эффектов.

В нормальной физиологии перекисное окисление липидов является важной составляющей частью системы регуляции. Однако, выходя за определенные пределы, процесс приобретает патогенетический характер, который проявляется денатурацией и инактивацией белка, делипидизацией мембраны, нарушением клеточного деления и роста клетки. Эти и другие действия контролируются антиоксидантной системой, которая играет важную роль в регуляции протекания свободно-радикальных превращений в организме, существенно влияя на его состояние. Поэтому антиоксиданты и исследование антиокислительных свойств различных соединений в последнее время получили широкое распространение.

Среди известных веществ, обладающих антиоксидантной защитой, обладает мексидол – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат – мощный ингибитор процессов перекисного окисления липидов, нейтрализующий свободные радикалы, активирующий супероксиддисмутазу и глутатионпероксидазу [1]. В присутствии мексидола активизируется сукцинатаксоксидазный путь окисления, что на ранних стадиях гипоксии в условиях ограничения НАД-зависимого окисления позволяет сохранить в митохондриях определенный уровень окислительного фосфорилирования. Фармакологические эффекты мексидола реализуются на сосудистом и нейрональном уровнях, оказывая антигипоксантажное, анксиолитическое, антистрессорное, нейропротективное, ноотропное и ряд других действий [1, 2].

Антибиотику тетрациклиновой группы – доксициклину (ДЦ) – по некоторым данным – присуще наличие так называемых неантибактериальных свойств, выражающихся не только во влиянии на иммунные реакции организма, но и белково-липидные компоненты его клеточных мембран [3, 4, 5], а также цитоархитектонику эритроцитов человека [6].

**Последовательность введения модификаторов в растворы оксигемоглобина человека (цифрами в скобках указан порядок использования раствора)**

| Пробирка | Кровь, мкл | Раствор ДЦ, мкл | Раствор мексидола, мкл | Раствор NaNO <sub>2</sub> , мкл | NaCl (0.9 %) мкл |
|----------|------------|-----------------|------------------------|---------------------------------|------------------|
| 1        | 150        | –               | –                      | –                               | 20               |
| 2        | 150        | –               | –                      | 10                              | 10               |
| 3        | 150        | –               | 10 (2)                 | 10 (1)                          | –                |
| 4        | 150        | 10 (2)          | –                      | 10 (1)                          | –                |
| 5        | 150        | –               | 10                     | –                               | 10               |
| 6        | 150        | –               | 10 (1)                 | 10 (2)                          | –                |
| 7        | 150        | 10 (2)          | 10 (1)                 | –                               | –                |
| 8        | 150        | 10              | –                      | –                               | 10               |
| 9        | 150        | 10 (1)          | –                      | 10 (2)                          | –                |
| 10       | 150        | 10 (1)          | 10 (2)                 | –                               | –                |

Для получения растворов гемоглобина цельную донорскую кровь с модифицирующими агентами промывали изотоническим раствором NaCl, центрифугировали в течение 5 минут со скоростью 3000 об./мин на центрифуге MiniSpin. К осадку эритроцитов в качестве гемолизирующего агента добавляли дистиллированную воду, клетки осаждали в течение 10 мин при 12 000 об./мин. Полученный раствор гемоглобина доводили до оптической плотности D ~ 0,8. Регистрацию электронных спектров поглощения растворов нативного и модифицированного гемоглобина проводили на спектрофотометре Shimadzu UV-401PC в диапазоне длин волн от 200 до 750 нм (через 1 нм). Статистическую обработку данных проводили с помощью прикладных пакетов Microsoft Excel.

**ЦЕЛЬ РАБОТЫ**

Изучить структурно-функциональные свойства гемоглобина, выделенного из эритроцитов донорской крови в условиях его предварительной инкубации модифицирующими агентами – мексидолом, доксициклином, нитритом натрия – по отдельности и в их сочетании.

**МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ**

Забор образцов крови (n = 20) осуществляли на Воронежской областной станции переливания в пробирки с гепарином натрия (Синтез, Россия) (+4 °С). В основе расчета концентрации модификаторов – разовая доза препаратов (8,75 × 10<sup>-7</sup> мкг/мл ДЦ, 4,47 × 10<sup>-6</sup> мкг/мл мексидола). Навеску ДЦ гидрохлорида (Sigma Aldrich), как и мексидола (Фармасофт), растворяли в заданном объеме 0,9%-го раствора NaCl. В цельную кровь объемом 150 мкл добавляли совместно или по отдельности препараты, осторожно перемешивали и хранили в холодильнике при температуре +4 °С в течение 60 мин для антибиотика и 10 мин для нитрита натрия и мексидола. В общей сумме получали 10 образцов с различными комплексами «цельная кровь – модифицирующие агенты» (табл.).

Концентрации лигандных форм гемоглобина определяли, используя величины изменения спектральных характеристик и эмпирических формул [3, 4].

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Методом спектрофотометрии проведена регистрация спектральных характеристик исследуемых модификаторов (рис. 1).

Как следует из представленных данных, мексидол характеризуется наличием четко различимых пиков в области 200, 295 нм, а ДЦ – при 272 и 345 нм. Установлено, что молекулы мексидола не вызывают значительных изменений в молекуле гемоглобина человека (рис. 2).

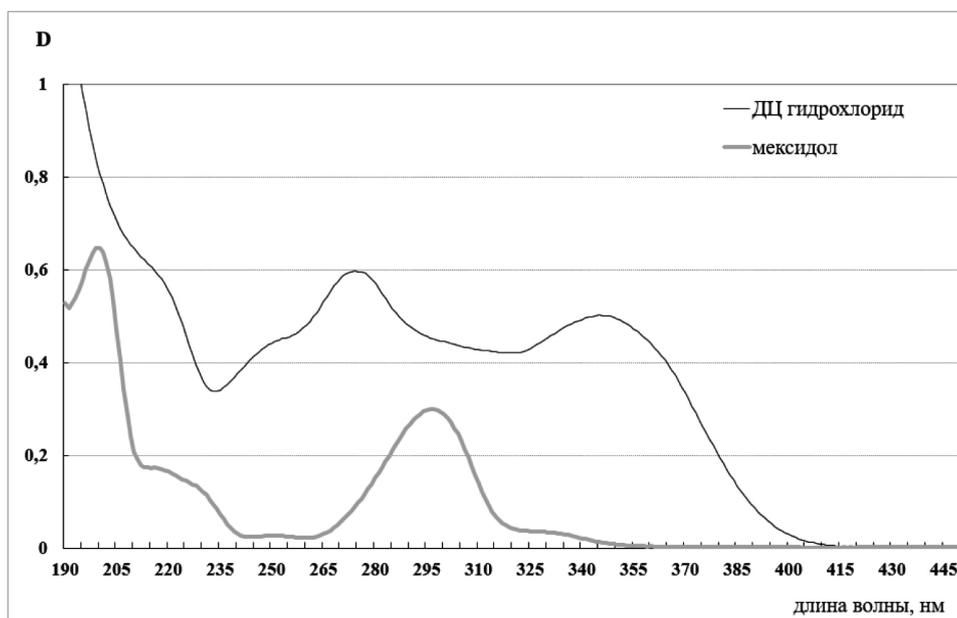


Рис. 1. Спектры поглощения растворов мексидола и доксициклина гидрохлорида

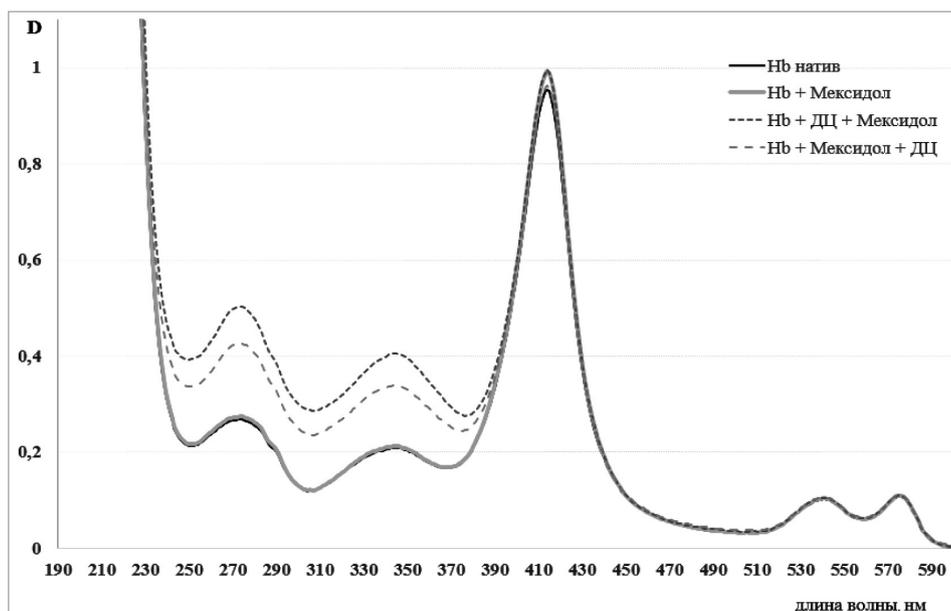


Рис. 2. Спектры поглощения растворов оксигемоглобина в присутствии мексидола и доксициклина гидрохлорида

В то же время сочетанное его использование с ДЦ способствует перераспределению электронной плотности в белковой области спектра, что может быть объяснено комплексообразованием модификаторов с молекулами гембелка. Последовательное введение в раствор мексидола и ДЦ, либо ДЦ и мексидола вызывает изменения спектральных свойств, проявляющиеся при длинах волн  $\lambda = 272$  нм и 342 нм. Исходя из этого, можно отметить, что белковая часть гемоглобина может изменять свои структурно-функциональные особенности и расположение гемового кармана. Введение в среду нитрита натрия способствует окислению ге-

моглобина, что подтверждается высокой интенсивностью полос поглощения при 408 и 630 нм (рис. 3).

Обращает на себя внимание тот факт, что при взаимодействии модифицированной ДЦ крови с нитритом натрия выявляется наименьшая степень окисления железа (38,4 %) по сравнению с другими исследованными образцами.

На основании исследования спектральных характеристик растворов оксигемоглобина человека, модифицированных ДЦ, мексидолом и нитритом натрия, установлено изменение соотношения лигандных форм гемопротеида в растворе (рис. 4).

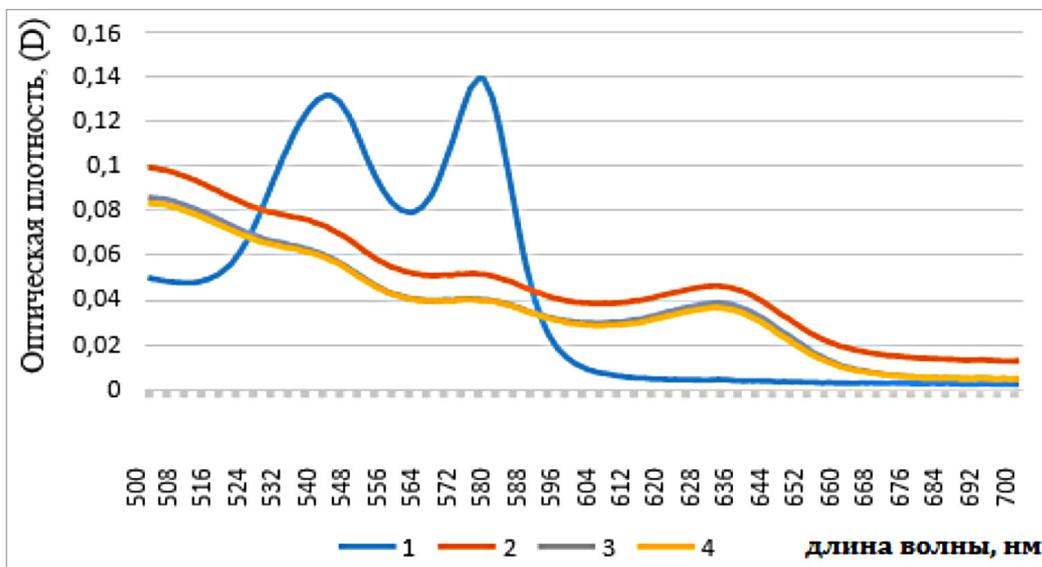


Рис 3. Спектры поглощения растворов гемоглобина в присутствии модификаторов:

1 – контроль (нормальный спектр); 2 –  $HbO_2+NaNO_2$ , 3 –  $HbO_2+ NaNO_2+Мексидол$ , 4 –  $HbO_2+ NaNO_2+ ДЦ$  ( $p < 0,05$ )

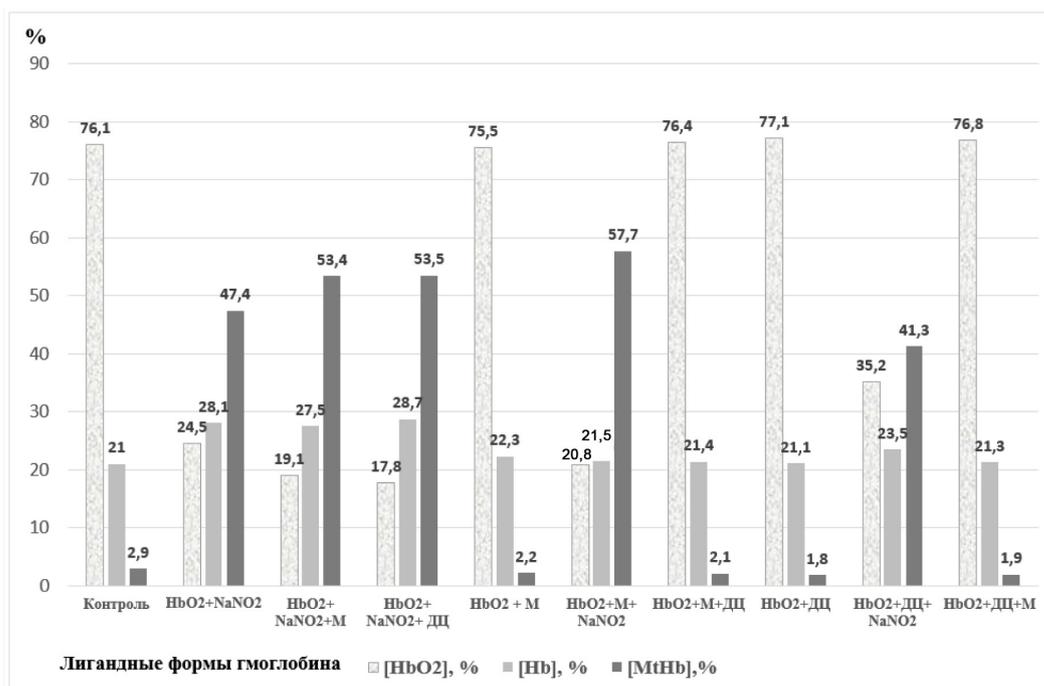


Рис. 4. Соотношение лигандных форм гемоглобина в растворе:

ДЦ – доксицилин, М – мексидол ( $p < 0,05$ )

Следовательно, последовательность введения модификаторов в растворы гемоглобина оказывает прямое влияние на структурно-функциональное состояние последнего, а следовательно, и на его способность связывать и удерживать кислород. Полученные данные доказывают факт взаимодействия ДЦ с белково-липидными компонентами гемоглобина человека, проявляющийся в перераспределении электронной плотности в молекулах

гембелка. По-видимому, наименьший уровень образования метгемоглобина (41,3%) достигнут в результате конкурентного связывания нитрит-ионов с гемовым карманом гембелка в сравнении с другими растворами, содержащими нитрит натрия (47,4 %, 53,4 %). Таким образом, ДЦ может оказывать защитный эффект от окислителей, таких как нитрит натрия, что требует продолжения исследований в данной области.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Индукцированное модификаторами изменение спектральных свойств оксигемоглобина, по-видимому, является отражением волны конформационных изменений на уровне гема и глобина, что сопровождается частичным отрывом лиганда (O<sub>2</sub>) от молекулы белка. На клеточном уровне подобные процессы могут найти отражение в изменении кислородтранспортной способности эритроцитов (их частичная деоксигенация), а повышенное сродство ДЦ к молекулам гемопро- теида, обнаруженное в наших модельных системах, потенциально затронет состояние белково-липидных компонентов клеток крови.

**СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Shchukin I.A., Fidler M.S., Koltsov I.A., Suvorov A.Y. COVID-19-Associated Stroke. *Neurosci Behav Physiol.* 2022; 52(5):649–656.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Стаховская Л.В. и др. Опыт применения мексидола в неврологической практике. *Журнал неврологии и психиатрии.* 2018;10:94–104.
3. Стусь Л.К., Розанова Е.Д. Осцилляция форм гемоглобина в процессе хранения крови. *Биофизика.* 1992;37(2):387–388.
4. Golub L.M., Elburki M.S., Walker C. et al. Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. *International Dental Journal.* 2016;66(3):127–135.
5. Hadjimichael A.C., Foukas A.F., Savvidou O.D. et al. The anti-neoplastic effect of doxycycline in osteosarcoma as a metalloproteinase (MMP) inhibitor: a systematic review. *Clin Sarcoma Res.* 2020;30:10:7.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Информация об авторах**

*Е.С. Баева* – кандидат биологических наук, доцент кафедры нормальной физиологии, Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж, Россия; ✉ galaxy1985@mail.ru

*В.Г. Артюхов* – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; artyukhov@bio.vsu.ru

*О.С. Куркина* – магистр кафедры биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия; kuurochka@gmail.com

Статья поступила в редакцию 26.06.2023; одобрена после рецензирования 14.10.2023; принята к публикации 28.11.2023.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Information about the authors**

*E.S. Baeva* – Candidate of Biological Sciences, Associate Professor of the Department of Normal Physiology, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russia; ✉ galaxy1985@mail.ru

*V.G. Artyukhov* – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; artyukhov@bio.vsu.ru

*O.S. Kurkina* – Master of the Department of Biophysics and Biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, Russia; kuurochka@gmail.com

The article was submitted 26.06.2023; approved after reviewing 14.10.2023; accepted for publication 28.11.2023.

6. Бабаскина А.И., Баева Е.С., Артюхов В.Г. Анализ воздействия некоторых солей доксициклина на структурное состояние эритроцитов и гемоглобина человека. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2021;2:62–68.

**REFERENCES**

1. Shchukin I.A., Fidler M.S., Koltsov I.A., Suvorov A.Y. COVID-19-Associated Stroke. *Neurosci Behav Physiol.* 2022;52(5):649–656.
2. Gromova O.A., Torshin I.Ju., Stahovskaja L.V. et al. Experience of using mexidol in neurological practice. *Zhurnal neurologii i psichiatrii = Journal of neurology and psychiatry.* 2018;10:94–104. (In Russ.).
3. Stus' L.K., Rozanova E.D. Oscillation of hemoglobin forms during blood storage. *Biofizika = Biophysics.* 1992; 37(2):387–388. (In Russ.).
4. Golub L.M., Elburki M.S., Walker C. et al. Non-antibacterial tetracycline formulations: host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. *International Dental Journal.* 2016;66(3):127–135.
5. Hadjimichael A.C., Foukas A.F., Savvidou O.D. et al. The anti-neoplastic effect of doxycycline in osteosarcoma as a metalloproteinase (MMP) inhibitor: a systematic review. *Clin Sarcoma Res.* 2020;30:10:7.
6. Babaskina A.I., Baeva E.S., Artyukhov V.G. Analysis of the effect of certain doxycycline salts on the structural state of human erythrocytes and hemoglobin. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2021;2:62–68. (In Russ.).